

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19592376

研究課題名（和文）メカニカルストレスに伴う歯周組織のコラーゲン分解・産生について

研究課題名（英文） Degradation and generation of collagen from periodontal tissues incident to mechanical stress

研究代表者

栗原三郎 (KURIHARA SABURO)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：70126225

研究成果の概要：

骨芽細胞に対して機械的な刺激を加える実験系を用い、メカニカルストレスに伴う歯周組織のコラーゲン分解・産生に関する研究を行った。さらに、in vivo における遺伝子の特定も行った。in vitro の実験系における、培養シャーレの底面が自由に伸縮細胞実験系により、培養骨芽細胞および培養線維芽細胞にメカニカルストレスを加え、その経時的形態変化、細胞増殖能、コラーゲン合成能、コラーゲン分解能などを検討した結果、細胞形態変化と細胞増殖能、コラーゲン合成・分解の間に強い関係が認められた。また、in vivo の実験系では、Msx2 などの遺伝子が牽引力と関係があることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：メカニカルストレス、歯周組織、骨芽細胞、牽引、  
コラーゲン合成、コラーゲン分解

## 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正臨床において、矯正力を加えると、まず最初に器械的刺激が歯根膜線維が歯根膜線維芽細胞へ伝達される。その結果、歯根膜圧迫側には破骨細胞が出現し歯槽骨を食

食する。一方、歯根膜牽引側には骨芽細胞が活性化され、また増殖し、歯槽骨形成が行われる。これが、歯科矯正学における歯の移動原理である。その原理に従い、骨吸収と骨形成を介して、歯は力のかかった方向へと移動

する。これまでに、これら機械的な刺激による骨吸収や骨形成の反応については多くの実験が行われており、その研究結果も多く報告がみられる。

しかしながら、その歯周組織に対するメカニカルストレスに対して、歯周組織を主として構成する線維芽細胞はコラーゲン分解とコラーゲン合成を繰り返すが、その過程が明確にされていない。また、歯科矯正学の分野と同様に、歯科補綴学や歯周病学の分野でも、歯周組織に対するメカニカルストレスの重要性は報告されているが、その反応過程は明確になっていない。したがって、その反応過程のうち、歯根膜細胞や骨芽細胞がメカニカルストレスに対応し、コラーゲン分解と合成を行う過程に照準を当て、検討を行なった。

## 2. 研究の目的

歯根膜を構成する細胞が、メカニカルストレスに対応し、細胞形態変化、コラーゲン分解、コラーゲン合成を行う過程を明確にすることを目的とした。主として、細胞培養実験系を用い、機械的刺激に対応する歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞の形態変化、およびコラーゲン分解と合成の機序を明確にする実験系を準備した。

## 3. 研究の方法

まず第一に、マウス培養骨芽細胞に対して機械的な刺激を加える実験系を開発した。すなわち、底面がフレキシブルな培養シャーレに、底面より陰圧を断続的に加え、底面に伸縮を加えることにより、細胞に機械的刺激を加えるものである。この実験システムは、空気圧を増減することにより、培養シャーレの底面を上下することが可能になっており、この変位によりシャーレ底面を進展と収縮を繰り返すことが可能になる。この進展収縮時間は任意に決定することが可能で、マイクロコンピュータにより、自由な時間に設定することができる。研究に用いた細胞は、マウス長官骨より得られた骨芽細胞とマウス口腔内より採取した繊維芽細胞である。

さらに、同じフレキシブル培養シャーレを応用し、底面に石膏のできた山形半球をあて、シャーレ上部より荷重を加えることにより、培養線維芽細胞に機械的な一過的な伸展力を段階的に加えることが可能な実験系を確立し、実験に供した。

次に、これらの実験器具を用い、培養細胞に機械的刺激を加え、機械的刺激の細胞変化に対する初期変化の様相を明確にするために、牽引力をかけた直後からの培養細胞微速度ビデオ撮影法を開発し、細胞携帯の経時的な変化を連続的に検討した。

また、その際の細胞形態の連続な形態変化の把握と同時に、細胞分裂能、コラーゲン合

成能、コラーゲン分解能などを分析した。

## 4. 研究成果

### (1)

底面がフレキシブルな培養シャーレに様圧と陰圧を加えることにより、シャーレに蒔かれている骨芽細胞が牽引力を定期的に受けていることを、連続観察ビデオ顕微鏡法により、細胞形態の変化を明確に捉えた。さらに、機械的な刺激の細胞変化に対する初期変化の様相を明確にするために、牽引力をかけた直後からの培養細胞微速度ビデオ撮影法を開発し、検討した。

牽引刺激を受けた細胞は、まず最初に、細胞外部のマトリックスに対して、やや遅れて伸展を始めることが理解された。最初は牽引された方向に沿って移動し、牽引されることが判明した。さらに、この細胞自体の伸展が、次のステップであるコラーゲン合成系を刺激し、さらには、細胞分裂能やコラーゲン分解酵素の合成系も刺激するのではないかと考察された。

すなわち、フレキシブル培養シャーレの底面は同心円状に牽引されているので、底面上に蒔かれている細胞は、まず、放射線上に牽引される。その後、やや後戻りするよう形態変化を示すが、機械力を加える以前の状態に比べると、牽引拡大されている。この最初の変化は機械的な変位を加えてから1分-5分で起こる初期変化であり、細胞が環境の変化に追従している様相が見られた。その後は、この機械的なストレスを最小にするような形態変化を示していた。すなわち、細胞は同心円状に再配列し、放射線上のメカニカルストレスに対応するかのよう細胞配置を示した。これは、一時的には、外的な刺激に準じる配列を示し、二次的には、外的な刺激を排除するような細胞は配列を示したものと考えられた。

### (2)

一方、石膏製山形半球模型にフレキシブルシャーレを押し付けてシャーレ底面に蒔かれている細胞を維持的に牽引する実験では、連続的に細胞形態の変化をビデオ顕微鏡で観察することが可能であり、明瞭に細胞形態変化が観察された。前述の陰圧を連続的に加えることのできる実験系の場合と同様に、牽引開始5分前後で、細胞形態は放射状に牽引され、その後、同心円状へと変化した。そのことは、細胞が初期刺激に対し、順応するように変化し、その後、機械的変位のひずみを解消するように配列するという前述の実験を裏付ける実験結果となった。

### (3)

シャーレ底面がフレキシブルである培養

シャーレに蒔かれた種々の線維芽細胞に対し、強弱種々の牽引力をかけた際の細胞分裂能とコラーゲン合成能を検討した。

強い牽引力を加えた場合も、弱い牽引力を加えた場合も、実験後5分以内では、一時的に細胞増殖能は低下し、1時間前後経過した後に、実験以前のレベルまで回復し、その後、細胞増殖能は増加した。すなわち、刺激を加えた直後は細胞増殖能はやや減少したが、一定の時間を経過した後は、刺激を加える以前より増加することが明確となった。すなわち、牽引刺激を直接線維芽細胞に加えると、一定の時間をおいて、組織内DNA量が増加し、細胞増殖が盛んに行われることが判った。

強い力と弱い力を加えた異なる実験で比較検討すると、弱い力を加えた方が、上昇へ変更する時間が早い、細胞増殖の程度は、強い力を加えた方が高いことが明確となった。

さらに、同じような変化がコラーゲン合成能を比較した実験でも認められ、機械的な刺激と細胞増殖能およびコラーゲン合成能はほぼ平衡して移行することが理解された。

#### (4)

次に、各種細胞に対し、牽引力となるメカニカルストレスを加えた際のコラーゲン分解能を検討する実験を行った。コラーゲン分解能を把握するためには、コラーゲナーゼ活性測定試薬を用い、分析した。コラーゲナーゼ活性測定試薬には、Chondrex社製のコラーゲナーゼ活性測定キットFITC標識タイプIを用いた。このFITC標識コラーゲンを細胞培養の培養液内に投入し、コラーゲン分解能を経時的に分析した。

初期変化として、コラーゲン分解能の低下が一時的に観察された。ついで、機械的な刺激を加える前の状態にまで回復し、さらに時間が経つと、コラーゲン分解能は増加していた。すなわち、機械的な刺激を受けた細胞は、一時的にはコラーゲン分解能は低下するが、その後、明確に増加することが判明した。

培養細胞も、線維芽細胞のみでなく、骨芽細胞でも、ほぼ同様の結果が得られた。

#### (5)

最後に、*in vivo*の実験系で、マウスの歯周組織や下顎頭軟骨内における機械的な刺激に反応する遺伝子について検討を加えた。

歯周組織内で、臼歯の移動を行い、その牽引側において、Runx2を誘導するMsx2の活性化が判り、メカニカルストレスに伴う細胞増殖やコラーゲン合成との関連性の追及が今後の課題となろう。

また、同様に*in vivo*の実験系の下顎頭軟骨内で、Jagged1遺伝子やJaggle2遺伝子の発現が見つかり、機械的な圧迫力との関係が考

察されていることから、細胞への圧迫力と細胞増殖やコラーゲン合成能との関係も考察することも可能であり、今後この分野における、より詳細なメカニズムの把握が必要であろう。

#### (6)

以上の実験をまとめると、以下のようになる。すなわち、細胞群にメカニカルストレスを加えた場合、直後には細胞形態の変化を伴う、細胞の再配列が行われた。その細胞の再配列には、機械的な刺激に、従順に呼応して反応するタイプのものと、機械的な刺激を吸収し、ストレスを緩める方向へ向わせるタイプの2種類が認められた。

また、この細胞形態変化と呼応して、細胞増殖とコラーゲン合成能およびコラーゲン分解能の機能も低下することが明らかとなった。

しかし、一定の時間を経過すると、多くの場合、細胞増殖とコラーゲン合成能およびコラーゲン分解能の機能が、刺激を加える以前より増強されることが判った。このことは、適度なメカニカルストレス（器械的な刺激）は細胞増殖ばかりでなく、その機能の一部であるコラーゲン合成能およびコラーゲン分解能を結果的に増加することが判った。しかしながら、この機序には、各種の遺伝子が関与しており、今後、これら遺伝子の関与を詳細に把握することが必要であろう。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①. Role of Msx2 as a promoting factor for Runx2 at the periodontal tension sides elicited by mechanical stress.

Watanabe T, Nakano N, Muraoka R, Shimizu T, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K, Kawakami T.

Eur J Med Res. 2008 Sep 22;13(9):425-31.

査読有

②. Jagged1 peptide appearing in mandibular condylar cartilage development.

Shimizu T, Okafuji N, Nakano K, Kurihara S, Kawakami T.

Eur J Med Res. 2008 Jan 23;13(1):4-6.

査読有

③. Gene expression of Jagged2 in mandibular condylar cartilage development.

Shimizu T, Tsujigiwa H, Nagatsuka H,  
Nakano K, Okafuji N, Kurihara S, Nagai N,  
Kawakami T.

Eur J Med Res. 2008 Jan 23;13(1):1-3.

査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

歯科基礎医学会 2008年9月23日 東京都  
村岡里奈他

“メカニカルストレスが引き起こすマウス  
歯根膜細胞における免疫組織化学的变化”

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗原三郎 (KURIHARA SABURO)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授  
研究者番号：70126225

### (2) 研究分担者

上松隆司 (UEMATSU TAKASHI)

松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・  
准教授

研究者番号：40203476

薄井陽平 (USUI YOHEI)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00387424

### (3) 連携研究者